

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
5 août 2004 (05.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/065946 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**G01N 21/64**

[FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris (FR).  
BIOMERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-L'Etoile (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
**PCT/FR2003/003656**

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **COCHET, Martine** [FR/FR]; 39 route de St Jean, F-38430 Moirans (FR). **PERRAUT, François** [FR/FR]; Les Nesmes, F-38134 Saint Joseph de Rivière (FR). **POUTEAU, Patrick** [FR/FR]; 10 allée Château Corbeau, F-38240 MEYLAN (FR). **REVOL-CAVALIER, Frédéric** [FR/FR]; 11, rue de la Saulne, F-38180 SEYSSINS (FR).

(22) Date de dépôt international :  
10 décembre 2003 (10.12.2003)

(74) Mandataires : **HECKE, Gérard** etc.; Cabinet Hecke, WTC Europole, 5, place Robert Schuman, B.P. 1537, F-38025 Grenoble Cedex 1 (FR).

(25) Langue de dépôt :  
**français**

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

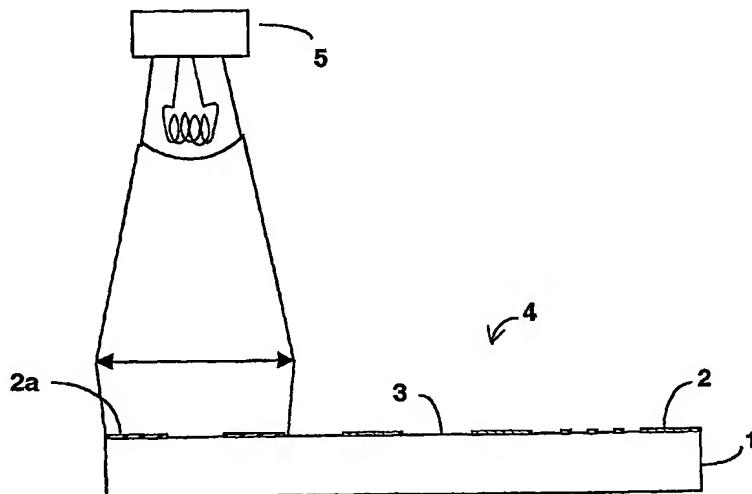
(26) Langue de publication :  
**français**

*[Suite sur la page suivante]*

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
**COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**

(54) Title: STANDARD MICRO-COMPONENT FOR CALIBRATING OR STANDARDIZING FLUORESCENCE MEASURING INSTRUMENTS AND BIOCHIP COMPRISING SAME

(54) Titre : MICRO-COMPOSANT ÉTALON POUR LE CALIBRAGE OU L'ÉTALONNAGE D'ÉQUIPEMENTS DE MESURE DE FLUORESCENCE ET BIOPUCE LE COMPORANT.



(57) Abstract: The invention concerns a standard micro-component (4) for calibrating or standardizing fluorescence measuring instruments, comprising a substrate (1) whereon is arranged at least one thin film (2). The thin film (2) includes fluorescent components. At least one first zone (3) of null thickness is formed in the thin film (2), thereby exposing the substrate (1). The thin film (2) comprises at least one exposed zone (2a), such that first and second fluorescence levels are respectively defined in the non exposed part and in the exposed part (2a) of the thin film (2). The second fluorescence level is lower than the first fluorescence level. The standard micro-component (4) can also include a plurality of stacked thin films so as to define a plurality of fluorescence levels.

*[Suite sur la page suivante]*

WO 2004/065946 A1



DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

---

(57) Abrégé : Un micro-composant étalon (4), destiné au calibrage ou à l'étalonnage d'équipements de mesure de fluorescence, comprend un substrat (1) sur lequel est disposée au moins une couche mince (2). La couche mince (2) comporte des composants fluorescents. Au moins une première zone (3) d'épaisseur nulle est formée dans la couche mince (2), exposant ainsi le substrat (1). La couche mince (2) comporte au moins une zone (2a) insolée, de sorte que des premier et second niveaux de fluorescence sont respectivement définis dans la partie non insolée et dans la zone insolée (2a) de la couche mince 2. Le second niveau de fluorescence est inférieur au premier niveau de fluorescence. Le microcomposant étalon (4) peut également comporter une pluralité de couches minces superposées de manière à définir une pluralité de niveau de fluorescence.

**Micro-composant étalon pour le calibrage ou l'étalonnage d'équipements de mesure de fluorescence et biopuce le comportant.**

**5 Domaine technique de l'Invention**

L'invention concerne un micro-composant étalon pour le calibrage et l'étalonnage d'équipements de mesure de fluorescence comprenant un substrat sur lequel est disposée au moins une couche mince comportant des composants fluorescents, ledit micro-composant comportant au moins des premier et second niveaux de fluorescence.

L'invention concerne également une biopuce comportant ledit micro-composant.

15 L'invention concerne également un procédé de fabrication dudit micro-composant comprenant le dépôt sur un substrat d'au moins une couche mince comportant des composants fluorescents.

**20 État de la technique**

Un micro-composant étalon connu (figure 1) comporte un substrat 1 en verre, non fluorescent, sur lequel est déposée une couche 2 en matériau organique fluorescent, de 3 microns d'épaisseur. Il comporte également des ouvertures 3 formées dans la couche 2 par gravure. Ce type de micro-composant permet d'obtenir un niveau de fluorescence correspondant à celui de la couche 2. Cependant les ouvertures 3 ont approximativement une largeur de 4 microns et

sont espacées les unes des autres de 8 microns, ce qui n'est pas satisfaisant pour le calibrage des instruments généralement employés.

Le document WO-A-0159503 décrit un micro-composant étalon comportant une couche fluorescente déposée sur un substrat. Il est généralement utilisé pour établir une base de référence entre différents microscopes et pour caractériser une qualité d'image, par exemple en termes de résolution, de contraste, de profondeur de champ et de distorsion. La couche est recouverte par un masque fin, comportant des ouvertures et non fluorescent. Le masque et la couche fluorescente sont plaqués l'un sur l'autre, ce qui nécessite trois opérations de fabrication : la réalisation de la couche, la réalisation du masque et leur assemblage. De plus, le masque et la couche étant réalisés en deux matériaux différents, ils ne peuvent pas être placés sur le même plan optique, au risque de déformer l'image optique de la zone observée.

Le document DE-A-10200865 décrit un étalon pour détecteur de fluorescence, l'étalon comportant plusieurs niveaux de fluorescence respectivement définis par des zones d'épaisseurs différentes. Chaque zone d'une épaisseur prédéterminée correspond à la superposition d'un nombre prédéterminé de couches minces en polymère. De plus, la caractéristique de fluorescence d'une couche mince dépend du taux de réticulation de la couche mince en polymère, le taux de réticulation étant obtenu par l'insolation de la couche mince lors d'une étape de photolithographie. Il est également indiqué que le phénomène d'oxydation des composants fluorescents dû à une insolation (phénomène dit de "Bleaching") est un phénomène néfaste qui est évité dans l'étalon décrit dans le document DE-A-10200865. Un tel étalon est cependant peu pratique à mettre en œuvre, sa fabrication nécessitant une succession d'étapes de réalisation longues et fastidieuses et l'étalon ainsi réalisé peut se révéler encombrant.

## Objet de l'invention

L'invention a pour but un micro-composant étalon ne présentant pas les inconvenients des micro-composants étalons de l'art antérieur et facile à réaliser.

Selon l'invention, ce but est atteint par les revendications annexées.

Plus particulièrement, ce but est atteint par le fait que les premier et second niveaux de fluorescence sont respectivement définis par une partie non insolée et par au moins une zone insolée de ladite couche mince, le second niveau de fluorescence étant inférieur au premier niveau de fluorescence.

Selon un développement de l'invention, la couche mince comporte au moins une ouverture définissant un troisième niveau de fluorescence inférieur aux premier et second niveaux de fluorescence.

Selon un mode de réalisation préférentiel, la couche mince comporte une pluralité de zones insolées de manière à définir une pluralité de niveaux de fluorescence différents.

Selon une autre caractéristique de l'invention, le micro-composant étalon comporte une pluralité de couches minces superposées, de manière à définir une pluralité de niveaux de fluorescence.

25

L'invention a également pour objet une biopuce comportant, sur un même substrat, au moins une sonde biologique et au moins un micro-composant étalon tel que décrit ci-dessus.

L'invention a également pour but un procédé de fabrication d'un tel micro-composant étalon.

Selon l'invention, ce but est atteint par le fait que le procédé consiste à insolter au moins une zone de la couche mince de manière à ce que des premier et second niveaux de fluorescence soient respectivement définis par la partie non insolée et par la zone insolée de la couche mince.

## 10      **Description sommaire des dessins**

D'autres avantages et caractéristiques ressortiront plus clairement de la description qui va suivre de modes particuliers de réalisation de l'invention donnés à titre d'exemples non limitatifs et représentés aux dessins annexés, 15 dans lesquels :

La figure 1 est une représentation schématique d'un micro-composant étalon selon l'art antérieur.

La figure 2 représente schématiquement un premier mode de réalisation d'un 20 micro-composant étalon selon l'invention.

Les figures 3 et 4 représentent un second mode de réalisation d'un micro-composant étalon selon l'invention, respectivement avant et après gravure d'une seconde couche mince.

La figure 5 est une représentation schématique d'une biopuce comprenant un 25 micro-composant étalon selon l'invention.

Les figures 6 et 7 représentent des troisième et quatrième modes de réalisation d'un micro-composant étalon comportant une couche mince de protection selon l'invention.

**Description de modes particuliers de réalisation.**

Sur la figure 2, un micro-composant étalon 4 destiné au calibrage ou à l'étalonnage d'équipements de mesure de fluorescence, tels que les 5 microscopes de fluorescence confocale ou non, comporte un substrat 1, non-fluorescent, sur lequel est disposée au moins une couche mince 2. Le substrat 1 est, de préférence, constitué par un matériau choisi parmi le silicium, la silice, le quartz, les plastiques et les verres.

La couche mince 2 comporte des composants fluorescents définissant un 10 premier niveau de fluorescence. Elle peut être réalisée en matériau fluorescent ou comporter des particules ou des molécules fluorescentes. Ainsi, elle peut être constituée par une résine photosensible, fluorescente ou comportant des particules fluorescentes, telles que la Duramide® 7505 commercialisée par la 15 société OLIN Microelectronic Material.

La couche mince 2 est déposée sur le substrat 1, par tout type de procédé connu. À titre d'exemple, elle peut être déposée par un procédé de dépôt chimique en phase vapeur, sous basse pression dit procédé LPCVD (« Low 20 Pressure Chemical Vapor Deposition »), ou sous plasma aussi appelé procédé PECVD (« Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition »). La couche mince 2 peut également être réalisée par un dépôt de tetraethoxysilane ( $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  ou TEOS), par un procédé de dépôt par centrifugation d'une couche de photorésine connu sous les termes anglo-saxon de « spin-coating », par un dépôt localisé de 25 résine (procédé « lift-off »), par évaporation, par pulvérisation ou par trempage-étirage.

La couche mince 2 comporte, de préférence, au moins une ouverture 3 libérant la surface du substrat 1. Sur la figure 2, sept ouvertures 3 sont formées dans la couche mince 2 et elles définissent un second niveau de fluorescence correspondant au niveau de fluorescence du substrat 1. Le niveau de fluorescence du substrat est au moins 10 fois inférieur au premier niveau de fluorescence de la couche mince 2, et préférentiellement 100 inférieur au premier niveau de fluorescence. L'ensemble des ouvertures 3 forme des motifs et elles sont réalisées par tout type de moyens connus. Elles sont, par exemple, formées par gravure, par photolithographie, par photolithographie suivie d'une gravure (procédé « lift-off »). Ainsi, pour une couche mince 2 en résine photosensible, les ouvertures 3 sont, de préférence, réalisées par une étape de photolithographie classique (insolation puis révélation chimique).

La couche mince 2 comporte au moins une zone 2a insolée par une source lumineuse 5, qui est, par exemple, une lampe à vapeur de mercure. Deux zones 2a insolées sont représentées sur la figure 2. L'insolation des zones 2a de la couche mince 2 engendre une oxydation des composants fluorescents de la couche mince 2 réduisant leur caractéristique de fluorescence. Ce phénomène plus connu sous le nom anglo-saxon de « bleaching » est généralement considéré comme néfaste. Malgré ce préjugé, ce phénomène est, selon l'invention, utilisé pour diminuer, de manière contrôlée, les caractéristiques de fluorescence de la couche mince 2 au niveau des zones 2a, et donc le niveau de fluorescence des zones 2a. Ainsi, la couche mince 2 présente deux niveaux de fluorescence distincts respectivement définis par la partie non insolée de la couche mince 2 et par les zones insolées 2a.

Les zones 2a ont alors un niveau de fluorescence intermédiaire, inférieur au premier niveau de fluorescence défini par la partie non insolée de la couche

mince 2 non insolée et, dans l'exemple décrit, supérieur au second niveau de fluorescence des ouvertures 3. Le choix des paramètres tels que la longueur d'onde, la puissance et la période de temps du rayonnement lumineux émis par la source lumineuse 5 déterminent le niveau de fluorescence intermédiaire, pour qu'il soit inférieur au premier niveau de fluorescence de la couche mince non insolée et supérieur au second niveau de fluorescence, c'est-à-dire, le plus souvent, non nul. Ces paramètres sont ajustés en fonction du type de matériau constituant la couche mince ainsi que de l'épaisseur de celle-ci. À titre d'exemple, le niveau de fluorescence d'une couche mince en résine Duramide® 7505 d'environ 10 microns d'épaisseur peut être réduit de moitié en insolant la couche mince avec une lampe à vapeur de mercure, avec une puissance de 14500W/m<sup>2</sup> et une durée d'insolation de 240 minutes.

Le micro-composant 4 présente l'avantage d'être facile à réaliser. En effet, les techniques de mise en œuvre sont des techniques usuelles en micro-électronique qui permettent d'atteindre des dimensions de motifs de l'ordre de 0,3µm. Elles permettent de fabriquer collectivement un grand nombre de micro-composants étalons sur un même substrat et le nombre d'étapes de réalisation est limité. Ainsi, selon l'invention, un procédé de fabrication d'un micro-composant consiste à déposer sur un substrat au moins une couche mince comportant des composants fluorescents et à isoler au moins une zone de la couche mince de manière à ce que des premier et second niveaux de fluorescence soient respectivement définis par la partie non insolée et par la zone insolée de la couche mince.

25

Selon une première variante de réalisation, la couche mince 2 peut comporter une pluralité de zones insolées, de manière à définir une pluralité de niveaux intermédiaires de fluorescence différents. Les niveaux de fluorescence

intermédiaires sont déterminés en fonction des caractéristiques locales globales d'insolation (puissance et durée d'insolation). Ces caractéristiques globales sont obtenues au cours d'une ou plusieurs insolations successives, indépendantes ou complémentaires

5

Selon une autre variante de réalisation, le micro-composant étalon peut comporter en plus, une pluralité de couches minces superposées, pouvant être totalement, partiellement ou non insolées, de manière à définir une pluralité de niveaux de fluorescence. Chaque couche mince comporte au moins une ouverture 3 et les ouvertures 3 d'au moins deux couches peuvent être superposées. Le procédé de fabrication d'un tel micro-composant comporte alors le dépôt, sur le substrat, d'une pluralité de couches minces superposées. Ceci présente l'avantage de réaliser un micro-composant étalon ayant des dimensions équivalentes à celles des objets que le lecteur, dont on souhaite le calibrage ou l'étalonnage. En particulier, l'épaisseur du matériau fluorescent constituant les motifs est proche de celle des zones à mesurer sur des biopuces, par exemple. Ceci permet de calibrer le lecteur dans des conditions optiques équivalentes à celles de lectures usuelles. L'épaisseur du micro-composant étalon est, de préférence, inférieure à 50 microns, voir 10 microns.

Ainsi, sur la figure 3, une seconde couche mince 6 est déposée par tout type de moyen approprié sur le micro-composant étalon 4 comportant une première couche 2 telle que celle décrite à la figure 2. La seconde couche 6 recouvre alors les ouvertures 3, la première couche mince 2 et les zones 2a insolées. Les première et seconde couches 2 et 6 ont des caractéristiques de fluorescence distinctes, soit par la nature des composants fluorescents respectifs qu'elles

25

comportent, soit par leurs concentrations respectives en composants fluorescents.

Une partie de la seconde couche 6 est ensuite retirée (figure 4) par tout type de moyen approprié, de manière à former des zones 6a, 6b et 6c, recouvrant respectivement une partie des zones 2a de la première couche mince 2, une partie des ouvertures 3 et une partie de la couche mince 2. Les zones 6b définissent un troisième niveau de fluorescence correspondant à la caractéristique de fluorescence de la seconde couche mince 6. L'accumulation de plusieurs couches minces fluorescentes l'une sur l'autre augmentant d'autant le niveau de fluorescence, les zones 6a et 6c, respectivement superposées aux zones 2a et à la couche mince 2, définissent un quatrième et un cinquième niveau de fluorescence. Les quatrième et cinquième niveaux de fluorescence sont supérieurs au niveau de fluorescence le plus élevé des première et seconde couches 2 et 6 non insolées. Le micro-composant étalon 4 selon la figure 4, comporte alors 5 niveaux de fluorescence différents.

Le micro-composant étalon peut être réalisé sur un substrat, sur lequel sont ensuite réalisées des sondes biologiques. Ainsi, sur la figure 5, une biopuce 7 comporte un substrat 1, sur lequel sont déposés des sondes biologiques 8 et le micro-composant étalon 4. Il est alors possible de réaliser des biopuces comportant, sur un même substrat, au moins un micro-composant étalon et au moins une sonde biologique.

Les niveaux de fluorescence du micro-composant étalon peuvent également être stabilisés dans le temps, en disposant par dépôt, après insolation, au moins une couche mince de protection, sur au moins une partie des couches minces

du micro-composant étalon. La couche mince de protection permet d'isoler, du milieu extérieur, au moins une partie des couches minces.

À titre d'exemple représenté sur la figure 6, un micro-composant 4 du type représenté sur la figure 2, comporte un substrat 1 non-fluorescent, sur lequel est disposée au moins une première couche mince 2 structurée. La couche mince 2 peut également être constituée de molécules biologiques marquées par des particules ou des molécules fluorescentes. Dans ce cas, cette couche est réalisée et définie par tout type de procédés connus dans le domaine des 5 biopuces (fonctionnalisation, hybridation, adsorption...). Le micro-composant comportant ce type de couche mince peut, alors, servir de biopuce de référence.

La première couche mince 2 est recouverte d'une couche mince de protection 9, destinée à isoler la première couche mince 2 du milieu extérieur dans lequel se trouve le micro-composant 4. Le milieu extérieur est généralement de l'air. Ainsi, 10 la couche de protection 9 évite l'oxydation des composants fluorescents contenus dans la couche mince 2, ce qui rend les composants fluorescents stables dans le temps.

La couche de protection peut être opaque ou semi-transparente, lorsque la 20 lecture du micro-composant est réalisée à travers le substrat. Le substrat est, alors, transparent aux signaux optiques de lecture et qui peut être, par exemple, en verre, en silice ou en plastique. Au contraire, dans le cas où la lecture du micro-composant est réalisée du côté opposé au substrat, la couche de 25 protection 9 doit être transparente aux signaux optiques de lecture reçus et renvoyés par la première couche mince 2. Ceci permet d'exciter et d'observer le phénomène de fluorescence, sans le perturber.

La couche mince de protection 9 est réalisée par tout type de procédé approprié aux exigences de la couche de protection 9. À titre d'exemple, elle peut être réalisée par un procédé LPCVD, PECVD, par évaporation, par pulvérisation ou par "spin-coating". Avantageusement, la couche de protection 9 peut être structurée par tout type de moyens connus dans la microélectronique, de manière à recouvrir, par exemple, au moins une partie des zones fluorescentes.

Selon une variante de réalisation, la couche mince 2 peut être recouverte par une pluralité de couches minces de protection superposées. De plus, la ou les couches minces de protection peuvent être utilisées pour renforcer les caractéristiques de fluorescence de la couche mince 2. Dans ce cas, les couches minces de protection peuvent être du type des couches minces décrites dans le document WO-A-0248691. En particulier, le matériau formant la couche mince de protection peut être choisi parmi les matériaux suivants : TiO<sub>2</sub>, Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, HfO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, MgO, SiO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, MgF<sub>2</sub>, et YF<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>4</sub>Ti, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, le diamant et les oxynitrides. De plus, l'épaisseur de la couche mince de protection ou de chaque couche mince de protection est, de préférence, calculée à partir de la formule suivante : n.e = k. λ / 4, dans laquelle n est l'indice de réfraction du matériau composant la couche mince de protection pour une longueur d'onde λ du signal optique de lecture reçu par la première couche mince, e est l'épaisseur optique de la couche de protection et k est un entier impair. L'épaisseur optique correspond au produit de l'indice de réfraction n avec l'épaisseur de la couche mince considérée, pour la longueur d'onde considérée.

Comme représenté à la figure 7, le micro-composant étalon peut, comme sur la figure 4, comporter une pluralité de couches minces 2 et 6 superposées, de manière à définir une pluralité de niveaux de fluorescence. Après structuration de la couche mince 6, la couche mince de protection 9 est déposée sur le micro-

composant 4, de manière à recouvrir, par exemple, totalement les couches 2 et 6 et les parties découvertes du substrat 1. Le micro-composant 4, notamment destiné à l'étalonnage ou au calibrage des équipements de mesure de la fluorescence, comporte alors plusieurs niveaux de fluorescence protégés contre le milieu extérieur.

L'emploi d'une couche mince de protection permet de réaliser des micro-composants, tels que les puces étalons ou micro-composants étalons, ayant des caractéristiques de fluorescence stables dans le temps, ce qui permet de réaliser des comparaisons entre plusieurs mesures étalées dans le temps ou entre différents appareils de mesure, par rapport à une référence invariant dans le temps.

L'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation décrits ci-dessus. Ainsi, au moins une partie de la seconde couche mince 6 peut également être insolée, en même temps que les zones 2a, avant ou après, avec des paramètres d'insolation, tels que la longueur d'onde, la durée ou la puissance d'insolation, différents ou identiques.

## Revendications

1. Micro-composant étalon pour le calibrage et l'étalonnage d'équipements de mesure de fluorescence comprenant un substrat (1) sur lequel est disposée au moins une couche mince (2, 6) comportant des composants fluorescents, ledit micro-composant comportant au moins des premier et second niveaux de fluorescence, micro-composant caractérisé en ce que les premier et second niveaux de fluorescence sont respectivement définis par une partie non insolée et par au moins une zone insolée (2a) de ladite couche mince (2, 6), le second niveau de fluorescence étant inférieur au premier niveau de fluorescence.  
5
2. Micro-composant étalon selon la revendication 1, caractérisé en ce que la couche mince (2, 6) comporte au moins une ouverture (3) définissant un troisième niveau de fluorescence inférieur aux premier et second niveaux de fluorescence.  
15
3. Micro-composant étalon selon la revendication 2, caractérisé en ce que le troisième niveau de fluorescence correspond au niveau de fluorescence du substrat.
4. Micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que le troisième niveau de fluorescence est au moins 10 fois inférieur au premier niveau de fluorescence.  
20
5. Micro-composant étalon selon la revendication 4, caractérisé en ce que le troisième niveau de fluorescence est 100 fois inférieur au premier niveau de fluorescence.  
25

6. Micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la couche mince (2, 6) est constituée par un matériau fluorescent.

5 7. Micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la couche mince (2, 6) comporte une pluralité de zones insolées de manière à définir une pluralité de niveaux de fluorescence différents.

10 8. Micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la couche mince (2, 6) est constituée par une résine photosensible.

15 9. Micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le substrat (1) est constitué par un matériau choisi parmi le silicium, la silice synthétique, le quartz, les plastiques et les verres.

10. Micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'au moins une partie de la couche mince (2, 6) est recouverte par une couche mince de protection (9).

20 11. Micro-composant selon la revendication 10, caractérisé en ce que la couche mince de protection (9) est transparente à des signaux optiques de lecture reçus et renvoyés par la couche mince (2, 6).

25 12. Micro-composant selon l'une quelconque des revendications 10 et 11, caractérisé en ce que le micro-composant (4) comporte une pluralité de couches minces de protection (9) superposées.

13. Micro-composant selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le matériau formant la couche mince de protection (9) est choisi parmi les matériaux suivants : TiO<sub>2</sub>, Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, HfO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, MgO, SiO<sub>2</sub>, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, MgF<sub>2</sub>, YF<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZrO<sub>4</sub>Ti, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, le diamant et les oxynitrides.

5

14. Micro-composant selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que l'épaisseur de la couche mince de protection (9) est calculée à partir de la formule suivante : n.e = k. λ / 4, dans laquelle n est l'indice de réfraction du matériau composant la couche mince de protection (9) pour une longueur d'onde λ du signal optique de lecture reçu par la couche mince (2, 6), e est l'épaisseur optique de la couche mince de protection (9) et k est un entier impair.

10

15. Micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le micro-composant étalon (4) comporte une pluralité de couches minces (2, 6) superposées de manière à définir une pluralité de niveaux de fluorescence.

15

16. Micro-composant étalon selon la revendication 15, caractérisé en ce que les ouvertures (3) d'au moins deux couches minces (2, 6) sont superposées.

20

17. Biopuce caractérisée en ce qu'elle comporte, sur un même substrat, au moins une sonde biologique et au moins un micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.

25

18. Procédé de fabrication d'un micro-composant étalon selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, comprenant le dépôt sur un substrat (1) d'au moins une couche mince (2, 6) comportant des composants fluorescents, procédé

caractérisé en ce qu'il consiste à isoler au moins une zone (2a) de la couche mince (2, 6) de manière à ce que des premier et second niveaux de fluorescence soient respectivement définis par la partie non isolée et par la zone isolée (2a) de la couche mince (2, 6).

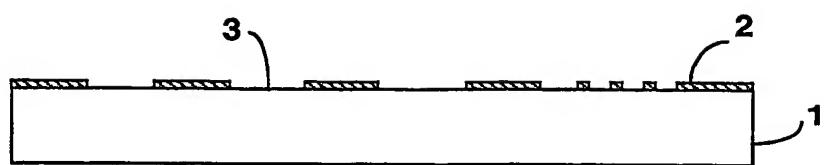
5

**19.** Procédé de fabrication d'un micro-composant étalon selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comporte le dépôt, sur le substrat (1), d'une pluralité de couches minces superposées (2, 6).

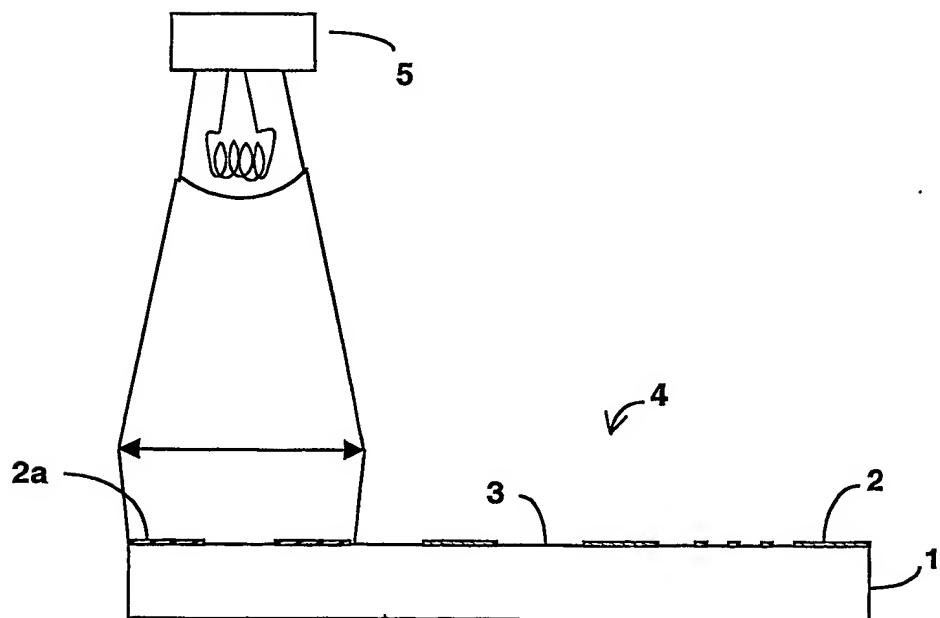
10

**20.** Procédé de fabrication d'un micro-composant étalon selon l'une des revendications 18 et 19, caractérisé en ce qu'il comporte après isolation le dépôt d'une couche mince de protection (9).

1/3



**Fig. 1 (Art antérieur)**



**Fig. 2**

2/3

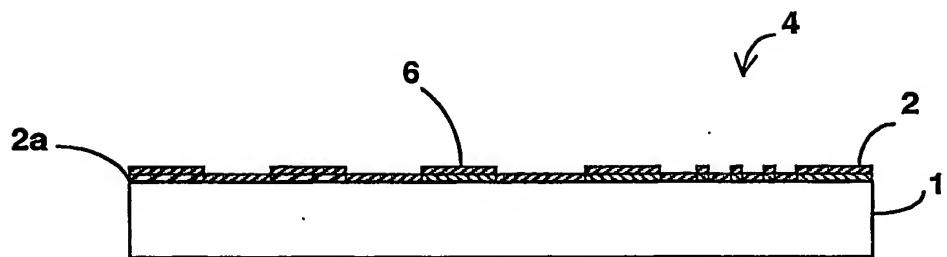


Fig. 3

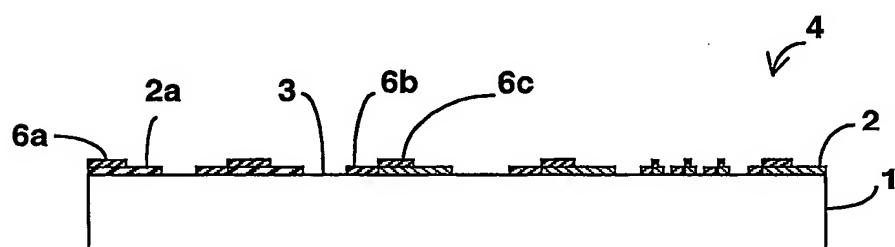


Fig. 4

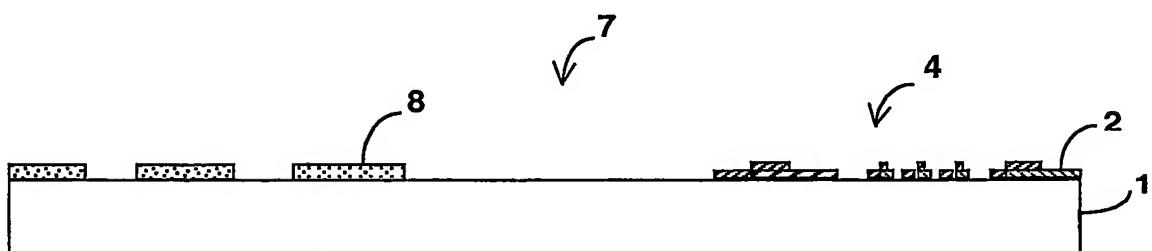


Fig. 5

3/3

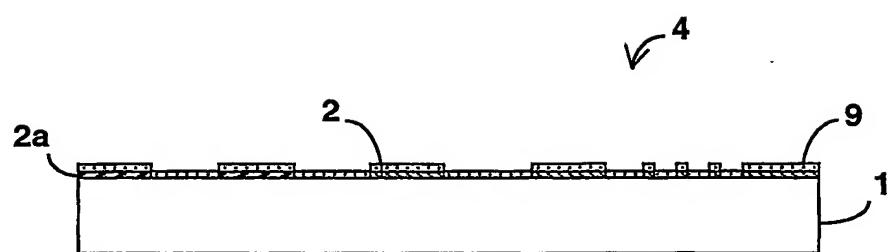


Fig. 6

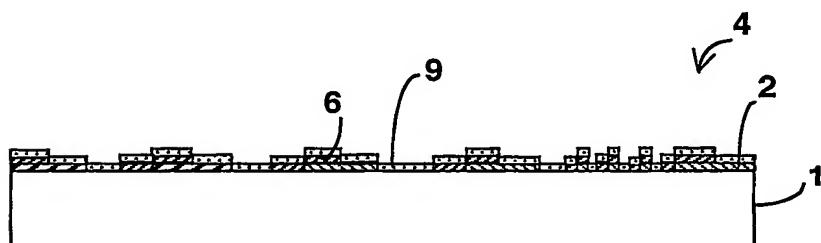


Fig. 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No

FR 03/03656

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 102 00 865 A (CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GMBH) 10 October 2002 (2002-10-10) alínéas '0033!-'0060!	1-9, 15-19
Y	US 6 242 114 B1 (SHINKLE MICHAEL W ET AL) 5 June 2001 (2001-06-05) * colonne 4, lignes 45-65 *	10-14, 20
Y	WO 02/48691 A (BARRITAULT PIERRE ;COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); CHATON PATR) 20 June 2002 (2002-06-20) cited in the application * page 6, lignes 10-22 *	14

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- °A° document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- °E° earlier document but published on or after the International filing date
- °L° document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- °O° document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- °P° document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

°T° later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

°X° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

°Y° document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

°&° document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

26 April 2004

Date of mailing of the International search report

06/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoogen, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/03656

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
DE 10200865	A	10-10-2002	DE	10200865 A1		10-10-2002
			CA	2441437 A1		03-10-2002
			WO	02077620 A1		03-10-2002
			EP	1373870 A1		02-01-2004
US 6242114	B1	05-06-2001	NONE			
WO 0248691	A	20-06-2002	FR	2818378 A1		21-06-2002
			EP	1346203 A1		24-09-2003
			WO	0248691 A1		20-06-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: Internationale No  
/FR 03/03656

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 GO1N21/64

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 GO1N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE 102 00 865 A (CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GMB) 10 octobre 2002 (2002-10-10) alinéas '0033!-'0060!	1-9, 15-19
Y	---	10-14,20
Y	US 6 242 114 B1 (SHINKLE MICHAEL W ET AL) 5 juin 2001 (2001-06-05) * colonne 4, lignes 45-65 *	10-14,20
Y	WO 02/48691 A (BARRITAULT PIERRE ;COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); CHATON PATR) 20 juin 2002 (2002-06-20) cité dans la demande * page 6, lignes 10-22 * -----	14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 avril 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/05/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hoogen, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D de Internationale No

/FR 03/03656

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 10200865	A 10-10-2002	DE 10200865 A1 CA 2441437 A1 WO 02077620 A1 EP 1373870 A1	10-10-2002 03-10-2002 03-10-2002 02-01-2004
US 6242114	B1 05-06-2001	AUCUN	
WO 0248691	A 20-06-2002	FR 2818378 A1 EP 1346203 A1 WO 0248691 A1	21-06-2002 24-09-2003 20-06-2002